

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

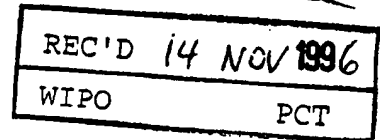
**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT



Herr Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Heidelberg/Deutsch-  
land hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Vektor-System für die Gentherapie am Herz-  
muskel"

am 17. November 1995 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Der Wohnort des Anmelders wurde geändert in:  
Groß Grönau/Deutschland.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wie-  
dergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmel-  
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklas-  
sifikation erhalten.

München, den 24. April 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Holß

Aktenzeichen: 195 42 838.2

17.11.95

17 NOV 95 14:45



1

## Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neues Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Das neue Vektor-System ist durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle gekennzeichnet, in dem ein therapeutisches Gen, gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.

17.11.95

3

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Es gibt verschiedene Formen der Kardiomyopathie. Ihr Krankheitsbild umfaßt eine Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, welche sich sowohl in kontraktilen als auch in elektrophysiologischen Störungen präsentieren und letztlich zur schweren Herzinsuffizienz und/oder zum plötzlichen, elektrophysiologischen Herztod führen. Die Suche nach monogenetischen Ursachen bei familiären Formen der dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathien ist derzeit Gegenstand zahlreicher grundlagenwissenschaftlicher und klinischer Untersuchungen. So konnten gerade in jüngster Zeit genetische Ursachen für Herzmuskelerkrankungen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Zudem ergibt sich aus dem Einsatz von molekularbiologischen Methoden ein neues Verständnis für molekulare Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz und der Kardiomyopathie. Nach Identifizierung genetischer Defekte und dem Nachweis einer veränderten Genexpression in erkrankten Herzmuskelgeweben ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte molekulare Veränderungen durch Übertragung von genetischem Material zu korrigieren bzw. zu kompensieren. Der bereits in der Krebstherapie und kürzlich auch bei der Muskeldystrophie angewandte Transfer von Fremdgenen in somatische Zellen des intakten Organismus stellt daher eine vielversprechende Methode dar, welche möglicherweise als gentherapeutisches Verfahren auch in der interventionellen Kardiologie eingesetzt werden könnte. Die am häufigsten für den somatischen Gentransfer verwendeten Vehikel sind die nicht replikationsfähigen Retroviren. Voraussetzung für eine erfolgreiche retr viral Inf kti n ist jedoch eine teilungsfähig Zielzell , wie zum Beispiel stark proliferierende Tumorzellen. Da eine Vielzahl somatischer Zellen einschließlich der Kardiomyozyten nicht mehr teilungsfähig sind, können retrovirale "Shuttle-Vektor" Systeme hier nicht verwendet werden.

17.11.95

4

Unter den verfügbaren Gentransfersystemen haben die rekombinanten Adenoviren verschiedene Eigenschaften, die sie für den somatischen Gentransfer in teilungsunfähige Zellen besonders attraktiv machen.]

Große Beachtung fand daher eine erst jüngst von Perricaudet und Rosenfeld entwickelte Technik des stabilen Gentransfers in Bronchialepithelien zur Therapie der zystischen Fibrose mittels rekombinanter Adenoviren. Diese Methode konnte von der Arbeitsgruppe Perricaudet auf teilungsunfähige Herz- und Skelettmuskelzellen der Maus übertragen werden. Therapeutisch wurde das adenovirale Gentransfersystem bereits an der Skelettmuskulatur eingesetzt, um das bei der progressiven Muskeldystrophie vom Typ Duchenne fehlende Dystrophinogen zu ersetzen. So zeigen nach intramuskulärer Virus-Applikation bis zu 50% der Skelettmuskelfasern eine mittels Immunhistochemie nachweisbare Expression des Dystrophinproteins.

Da bereits einige Formen der dilatativen Kardiomyopathie mit defektem Dystrophinprotein bzw. fehlendem Dystrophinogen beschrieben wurden könnte sich aus diesen Vorkenntnissen ein Ansatz zur spezifischen Gentherapie der Dystrophinopathie am Herzmuskel ergeben.

Das humane Adenovirus gehört zu der Klasse der doppelsträngigen DNA-Viren mit einem Genom von ca. 36 Kilobasenpaaren (Kb). Die virale DNA kodiert für etwa 2700 verschiedene Genprodukte, wobei man frühe ("early genes")- und späte ("late genes") Genprodukte in Bezug auf den adenoviralen Replikationszyklus unterscheidet. Die "early genes" werden in vier transkriptionelle Einheiten, E1 bis E4, unterteilt. Die späten Genprodukte kodieren für die Kapsidproteine. Immunologisch können mindestens 42 verschiedene Adenoviren unterschieden werden. Die zelluläre Aufnahme der Adenoviren erfolgt über den Mechanismus der Rezeptorvermittelten Endozytose in das lysosomale Kompartiment einer Vielzahl humaner Zelltypen. Danach wandert das adenovirale Genom ins Zytoplasma und anschließend zum Zellkern. Die Transkription der viralen Gene setzt die Expression der "early region 1" voraus, welche für einen Transaktivator der adenoviralen Genexpression kodiert.

17.11.95

6

5

Dies Abhängigkeit der Expression aller nachfolgenden viralen Gene von dem E1-Transaktivator kann für die Konstruktion der nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektoren genutzt werden.

In adenoviralen Vektoren wird die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden E1 Gene ersetzt. Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher durch homologe Rekombination in der sogenannten 293 Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der E1 Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines eigenen Promotors (z.B. RSV) Fremdgene (z.B.  $\beta$ -Galaktosidase) in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd.RSV/ $\beta$ -Gal und dem E1-defizienten adenoviralen Genom d1327 (Adenovirus 5) in der Helferzelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten, replikationsdefizienten Viren werden dann in hohen Titern ( $10^8$  bis  $10^{12}$  Plaque bildende Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder der Tiere eingesetzt. Die Größe eines rekombinanten adenoviralen Genoms ist auf ca. 38 bis 40 Kb beschränkt und muß bei der Konstruktion der adenoviralen Shuttle-Vektoren unbedingt berücksichtigt werden.

Mittels intravenöser (i.v.) Applikation von rekombinanten Adenoviren wurde das beschriebene  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen unter Kontrolle des retroviralen Promotors (RSV) bis zu 12 Monaten bereits stabil in muskulären Geweben exprimiert. Detaillierte Untersuchungen der Gewebeverteilung nach i.v. Applikation von rekombinanten Adenoviren mit Luciferase als Reportergen ergaben, daß in allen untersuchten Geweben Luciferase-Aktivität nachweisbar war.

Quantitativ zeigte sich jedoch eine präferenzielle Luciferase-Expression in der Leber (99%) der i.v. infizierten Tiere.

17.11.95

6

Zusätzliche Untersuchungen mit  $\beta$ -Galaktosidase produzierenden Adenoviren ergaben, daß ca. 90% aller Leberparenchym- und -endothelzellen das Fremdgen effektiv exprimierten. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der Verwendung des CMV-Promotors zu einer raschen Abnahme der Genexpression in der Leber. Daraus wird ersichtlich, daß bei dem Gentransfer in bestimmte Zielzellen nicht nur die Methode der viralen Applikation, sondern auch die Auswahl des für die stabile Expression wichtigen Promotors von entscheidender Bedeutung ist. Hinzu kommt die Immunantwort des Empfängerorganismus, die bei der i.v. Applikation zur Ausbildung hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen Kapsidproteine führt. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß unter Umständen der wiederholte Gentransfer mit rekombinanten Adenoviren zu einer erheblichen Abnahme der Transferrate führen kann.

Für die Herzmuskulatur wurde erst kürzlich von der Arbeitsgruppe Leiden ein stabiler Gentransfer durch direkte Infusion von  $2 \times 10^9$  replikationsunfähigen Adenoviren in die Koronararterien von Kaninchen erzielt. Mit diesem sogenannten "Percutaneous Coronary Gene Transfer" (PCGT) Verfahren war unter Kontrolle des CMV-Promotors sowohl in endothelialen als auch glatten Muskelzellen der Gefäße und in den ventrikulären Herzmuskelzellen eine Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens nachweisbar. Die aufgezeigten Untersuchungen weisen darauf hin, daß grundsätzlich verschiedene Zelltypen mittels intrakoronarer Infektion erreicht werden können. Für eine gezielte Expression wäre ein gewebespezifischer Promotor von großem Nutzen. Für die Therapie von Herzmuskelerkrankungen ist vor allem die gezielte kardiomyozytäre Expression von Interesse. /

*endothelial cell*

17.11.95

8

7

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß adenovirale Vektoren für den Gentransfer verschiedene Vorteile haben: ihre Unabhängigkeit von der Wirtszellreplikation, ihre Fremd-DNA-Verpackungskapazität von bis zu 7,5 kb, der hoch effiziente Gentransfer und ihr großes Wirtsspektrum. Ihre Fähigkeit, verschiedene Zelltypen zu infizieren, kann jedoch zur Expression von vermeintlichen therapeutischen Genen in nicht Zielzellen und damit unerwünschten Risiken führen./

Es ist bisher u.a. noch nicht gelungen, Adenoviren so zu verändern, daß sie für spezifische Expressionen in somatischen Zellen (z.B. Herzmuskelzellen) verwendbar sind. Ihr Einsatz für einen Gentransfer in Herzmuskelzellen für eine Therapie konnte deshalb bisher aus Sicherheitsgründen nicht in Betracht gezogen werden./

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein adenovirales Shuttle-Vektor-System mit gezielter, möglichst ausschließlicher Expressionsaktivität in Herzmuskelzellen zu entwickeln. Auf der Basis dieses Systems sollte ein Therapiekonzept für monogenetische Formen der Kardiomyopathien aufgebaut werden, welche maximale Sicherheit vor einer Expression in Zellen außerhalb des Herzmuskels bietet.

Teilziele sind die Klonierung eines herzmuskelspezifischen Promotors in das adenovirale System sowie die Untersuchung der Spezifität, Stabilität und Effizienz der Genexpression mit Hilfe der Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergene.

Es wurde gefunden, daß der MLC-2 Promotor (Myosin-Leicht-Kette-2-Promotor) in den adenoviralen Kontext überraschend gewebe-spezifisch ist. Darauf ist die vorliegende Erfindung aufgebaut, die gemäß den Ansprüchen 1, 6 und 7 realisiert wird. Die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Kontext?

Pg. 8



17.11.95

9

8

Das erfindungsgemäße Vektor-System ist durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle gekennzeichnet, in den ein therapeutisches Gen, gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.

Bevorzugt wird ein Vektor-System, das dadurch gekennzeichnet ist, daß als Basis für den Genshuttle ein Adenovirus eingesetzt wird.

Besonders bevorzugt ist ein Vektor-System, in dem ein rekombinationsdefizienter Adenovirus eingesetzt wird.

Als therapeutisches Gen wird die cDNA eines Gens verwendet, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ und quantitativ verändert ist.

Die Erfindung läßt sich auch realisieren, wenn Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Vektor-System wird hergestellt, indem in einem adenoviralen Vektor die El-Genregion oder eine andere Region durch ein therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.

Die Anwendung des neuen Vektor-Systems erfolgt bevorzugt dadurch, daß das Vektor-System konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes Kathederverfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.

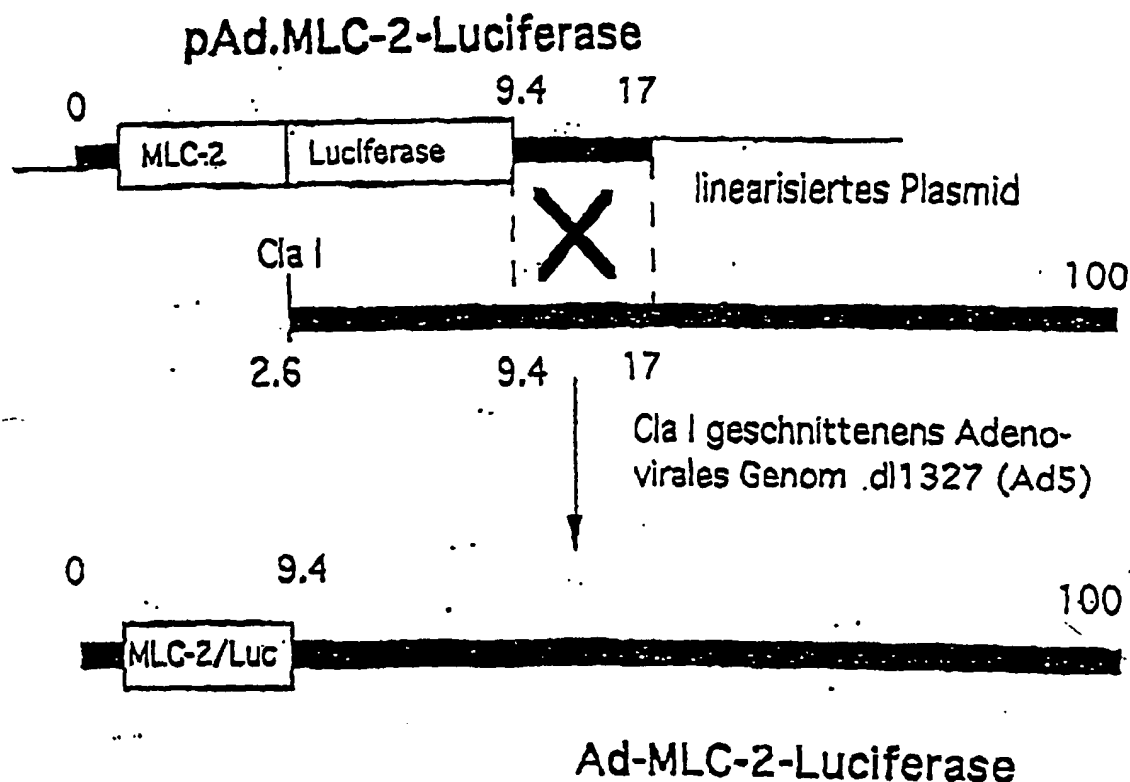
Die Erfindung soll nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

1. Zur Etablierung des Somatischen Gentransfers mit adenoviralen "Shuttle-Vektoren" werden rekombinante Adenoviren mit Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Reportargenen unter Kontrolle des MLC-2 Promotors nach folgendem Schema erzeugt:

17.11.95

9

10



**Abbildung:** Erstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-MLC-2-Luciferase mittels in vivo Rekombination.

Ad a) Klonierung des rekombinanten Plasmides pAd.MLC-2/Luciferase:

Das in ... beschriebene MLC-2/Luciferase Fusionskonstrukt wird an den Restriktionsschnittstellen Kpn I aus dem "Bluescript"-Plasmid herausgeschnitten. In einer anschließenden sogenannten "Klenow"-Reaktion werden die überhängenden Enden aufgefüllt und durch Zugabe von sogenannten Pvu II-Linkern zusätzliche Restriktionsenzymsschnittstellen an beiden Enden angebracht. Dieses 4.0 kb lange MLC-2/Luciferase-DNA Fragment wird dann in Analogie zu dem rekombinanten Plasmid pAd.RSVBgal in die Pvu II-Schnittstelle am 3'-Ende der 1.3 mu (1 mu = 360 bp) Region des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) Genoms gekoppelt.

17.11.95

M

10

An das Luciferase-Reportergen schließt sich das 9.4-17 mu lange DNA-Fragment von Ad 5, welches für die homologe Rekombination mit dem adeno-viralen Genom zur Bildung der rekombinanten Adenoviren notwendig ist, an. Die korrekte Orientierung des Fusionskonstrukts wird mittels Restriktions-enzymen und Sequenzierung überprüft.

Ad b) Erstellung der rekombinanten Adenoviren Ad-MLC-2-Luciferase:

Das rekombinate Adenovirus entsteht in vivo durch homologe Rekombination in der 293 Zelllinie zwischen dem neu konstruierten Plasmid pAd.MLC-2/Luciferase und der adeno viralen DNA Ad dl327. Hierzu werden die 293 Zellen mit 5 µg des linearisierten Plasmids pAd.MLC-2/Luciferase und 5 µg des 2.6-100 mu (1 mu = 360 bp) langen Cla I Fragmentes von Adenovirus 5 (Ad 5) kotransfiziert. Nach Überschichtung der Zellen mit Agar und 10-tägiger Inkubation bei 37°C werden rekombinante adenovirale Plaques isoliert und auf ihre Luciferaseaktivität hin überprüft. Die rekombinanten Adenoviren werden in der 293 Zelllinie vermehrt und mittels Cäsiumchloridgradienten zentrifugiert. Die viralen Überstände werden dann unter Verwendung der 293 Zelllinie im Plaqueassay austitriert.

Ad c) In vitro und in vivo Infektion von Kardiomyozyten:

Isolierte, neonatale Rattenkardiomyozyten werden mit diesen rekombinanten Adenoviren, Ad-MLC-2-Luciferase, in der Zellkultur infiziert und auf die Luciferaseexpression hin untersucht. Bei erfolgreicher in vitro Expression der Luciferase werden anschließend Ratten mit 20-40 µl von gereinigten, rekombinanten Adenoviren ( $10^{11}$  Plaque-formierende Einheiten/ml) über intravenöse Injektion, später auch über "Percutaneous Coronary Gene Transfer"  $2 \times 10^8$  infektiöse Partikel in die Koronararterien eingebracht.

17.11.95

11

+49 30 9494509

17 NOV '95 14:52

012

12

#### Ad d) Nachweis der Luciferase-Expression im Luciferase-Assay:

Für den Luciferase-Assay werden gesamtzelluläre Proteinextrakte aus den infizierten Kardiomyozyten- und Fibroblastenkulturen oder später aus infizierten Herzmuskelgewebe hergestellt. Bei erfolgreicher Infektion und aktivem MLC-2 Promotor befindet sich intaktes Luciferase-Enzym im Zellextrakt. Durch Zugabe der Substrate Luciferin und ATP entsteht unter Abspaltung von Pyrophosphat ein Komplex aus Luciferase-Luciferyl-AMP.

Durch Oxidation von Luciferyl kommt es zur Dissoziation von Oxiluciferin, AMP und CO<sub>2</sub> unter Aussendung eines Lichtquants mit der Wellenlänge 560 nm. Diese Lichtemission wird in einem Transilluminometer photometrisch in Lichteinheiten (LU) registriert und auf die Proteinmenge bezogen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden 5 Abbildungen dargestellt.

14-11-95 01:22

## II. Results

## 1. Construction of recombinant virus

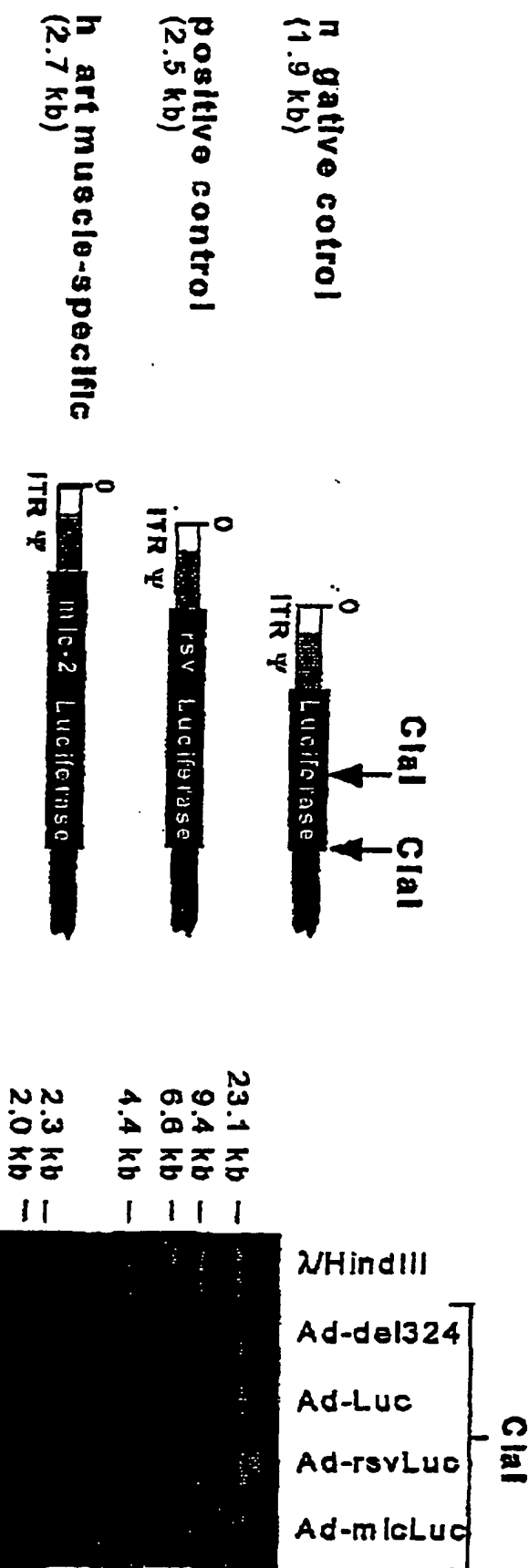


Fig. 1: The replication defective recombinant adenoviruses were constructed as described previously. The viruses are derivatives of adenovirus dAd324 (Ad5) with a deletion in E3 and the transgene replacing E1. The figure shows the left terminal region of the constructed viruses (LTR = Inverted Terminal Repeats,  $\psi$  = packaging sequence,  $\tau$ s = *tau*s sarcoma virus-promoter, *mhc-2* = myosin light chain 2-promoter) with different promoters driving the reporter gene luciferase. The negative control has no promoter (Ad-Luc), the positive control has the  $\tau$ s promoter (Ad- $\tau$ sLuc) and the heart muscle specific construct has the *mhc-2* promoter in front of the luciferase gene (Ad-*mhc-2*Luc). Clal restriction sites of the viral constructs are indicated in the drawing, the corresponding fragment length is given in brackets (left) and are visual on the agarose gel. The recombinant viruses were plaque purified two times before the viral clone was prepared large scale by two times CsCl Centrifugation. Viral DNA of the large scale virus production was isolated and restriction analysis confirmed the the recombinant phenotype. Additionally 50ng of viral DNA was tested by PCR for wild type adenovirus typ 5 contamination (Molecular Biology Techniques...). No wildtyp contamination was found (data not shown). The viral stocks were titered two times on 293 cells before infection experiments were done. The titers of the three constructs ranged from  $7 \times 10^6$  -  $1.8 \times 10^8$  p.f.u./ml.

17-11-95 01:22

17.11.95

## 2. Infection of tissue culture cell lines

adenovirus Ad-mLac is „transcriptionally silent“ in all investigated cell lines in terms of luciferase expression

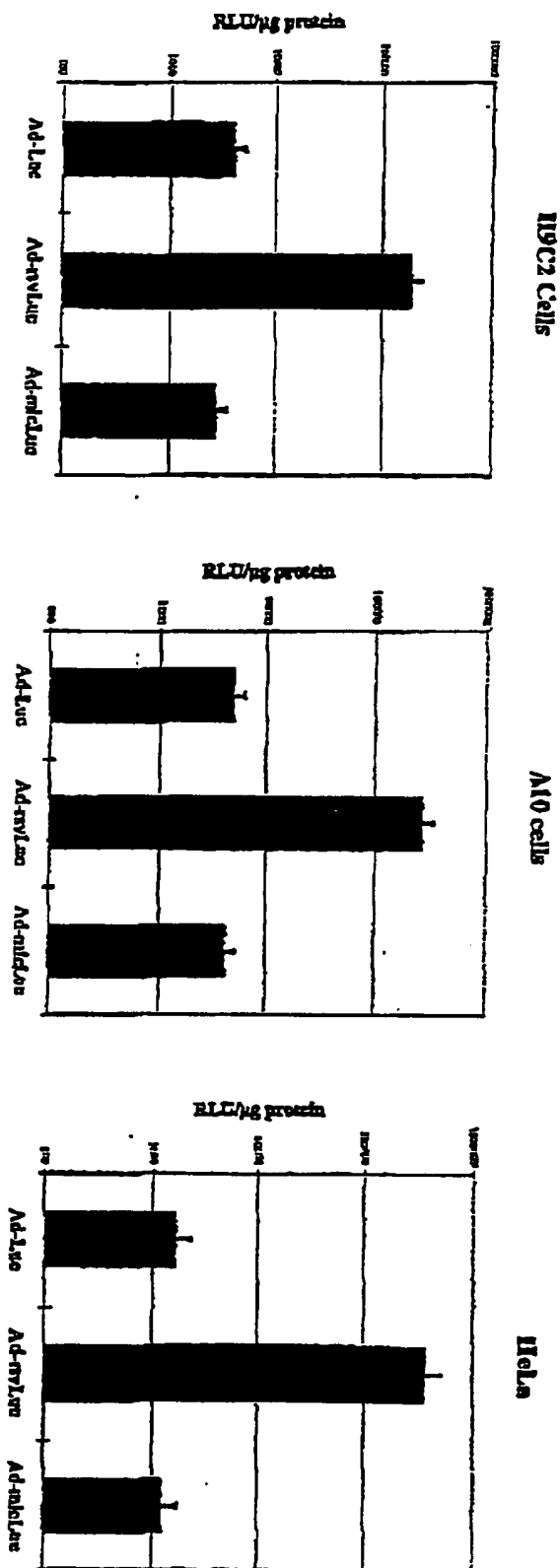


Fig.2.: Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/ $\mu$ g protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-mLac and Ad-mLac+ in H9C2 cells (heart myoblast, rat), A10 cells (smooth muscle cells, rat) and HeLa cells (cervical carcinoma, human). Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay were done according to standard procedures. Luciferase expression of Ad-mLac infected cell lines were lower as the negative control Ad-Luc. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

11-11-95 01:22

17.11.95

### 3. Infection of primary cells in tissue culture

adenovirus Ad-mLac specifically expresses luciferase in neonatal cardiomyocytes in vitro

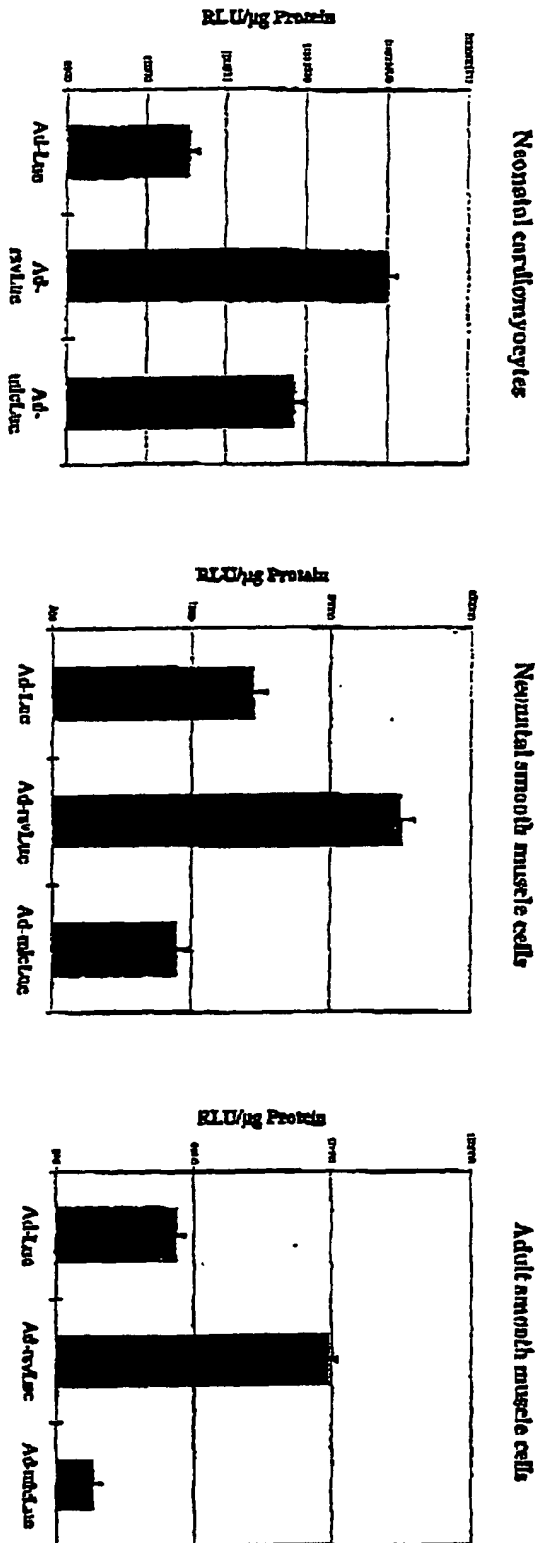


Fig.2.: Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/ $\mu$ g protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Lac, Ad-rsLac and Ad-mLac in primary neonatal cardiomyocytes (n), primary neonatal and adult smooth muscle cells (rat). Cardiomyocytes were infected two days after preparation from two-three days old animal, smooth muscle cells were infected at passage numbers 1-3. Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay were done according to standard procedures. Luciferase expression of Ad-mLac infected in cardiomyocytes was 8% of Ad-rsLac and about 10-fold compared to Ad-Lac. In smooth muscle cells Ad-mLac was about 0.25 of Ad-Lac. Each bar represents an arithmetic mean of four to five experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

17.11.95

#### 4. Intracardial infection of neonatal rats

adenovirus Ad-m1Luc specifically expresses luciferase in the myocardium in vivo

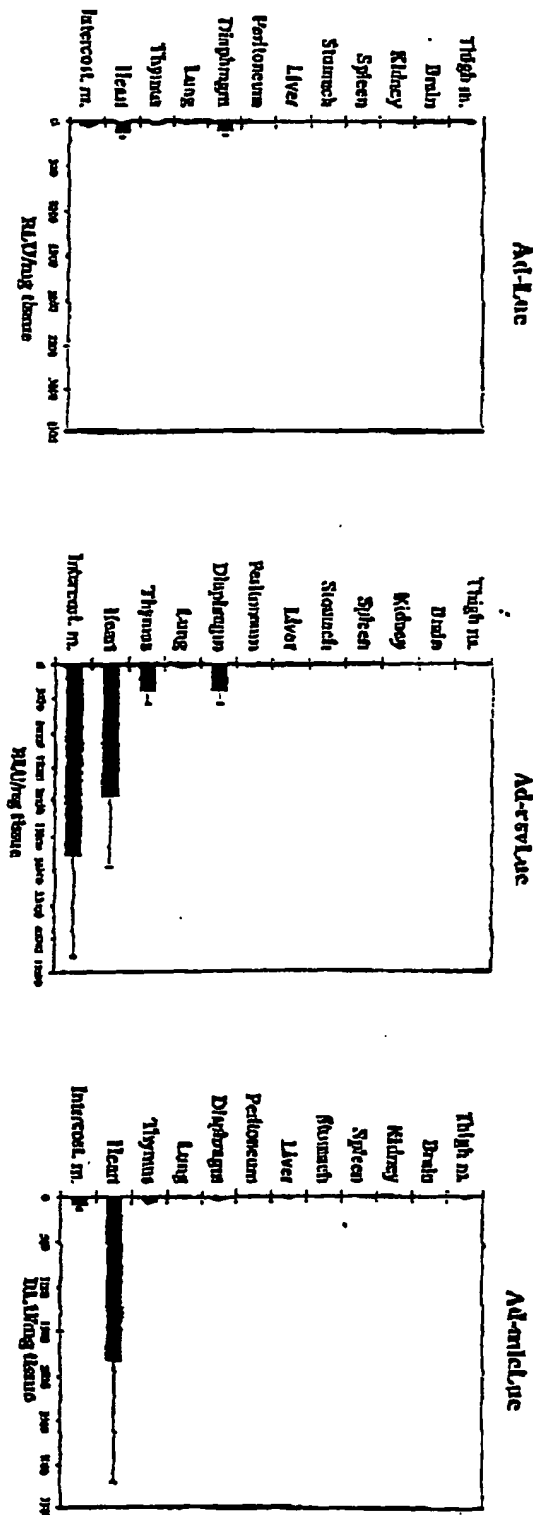


Fig.4.: Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rvLuc and Ad-m1Luc. Five days after administration of  $1.5-1.8 \times 10^9$  plaque forming adenoviral particles in a 20  $\mu$ l volume into the left ventricle of the heart luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU) mg tissue in each of 12 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.



# 5. Intramuscular injection of recombinant adenoviruses into thigh muscle of neonatal rats

- adenovirus Ad-rsvLuc strongly expresses luciferase in the thigh muscle in vivo
- adenovirus Ad-mcluc is "transcriptionally silent" in thigh muscle

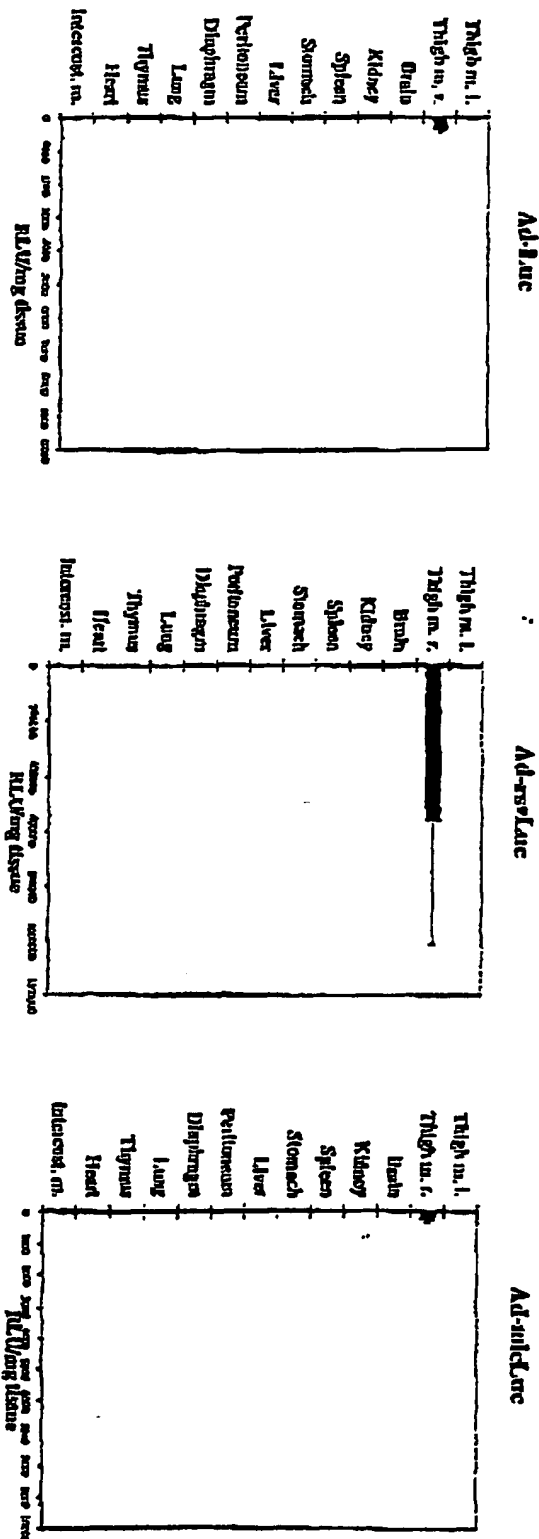


Fig.5.: Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-mcluc. Five days after administration of  $1.5 \times 10^8$  plaque forming adenoviral particles in a 20µl volume into the thigh muscle of the left hind leg luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU)/mg tissue in each of 13 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

17.11.95

17 NOV '95 14:47

18

### Patentansprüche

1. Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel, gekennzeichnet durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle, in den ein therapeutisches Gen , gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.
2. Vektor-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Basis für den Genshuttle ein Adenovirus eingesetzt wird.
3. Vektor-System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinationsdefizienter Adenovirus eingesetzt wird.
4. Vektor-System nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ oder quantitativ verändert ist.
5. Vektor-System nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt werden.
6. Verfahren zur Herstellung des Vektor-Systems nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß in einem adenoviralen Vektor die El-Genregion oder eine andere Region durch ein therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.
7. Verfahren zur Anwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß das Vektor-System konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes Kathederverfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.

### ***CERTIFICATION***

This is to certify that the attached English language document identified as "Vector System for Gene Therapy of the Heart Muscle," is a true and accurate translation of the corresponding German Language document No. DE-195-42-838.2 to the best of my knowledge and belief.

Date: March 17, 2004

Edeltraud F. Mahaney  
Edeltraud F. Mahaney  
Certified ATA Member  
No. 231343

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

(GERMAN COAT OF ARMS)

**CERTIFICATION**

(Stamp: Priority Document)

Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Heidelberg/Germany has filed with the German Patent Office a patent application with the title

"Vector System for Gene Therapy of the Heart Muscle"

on November 17, 1995.

The residence of the applicant was changed in:  
Gross Groenau/Germany.

The attached document is a true and accurate copy of the original of this patent application.

The application was tentatively assigned the International Patent Classification symbols C 12 N and A 61 K by the German Patent Office.

Munich, April 24, 1997

for

The President of the German Patent Office

signed: Hoiß

Reference No.: 195 42 838.2

November 17, 1995

## Vector System for Gene Therapy of the Heart Muscle

### Abstract

The invention relates to a new vector system for gene therapy of the heart muscle. Fields of application are the medical field and the pharmaceutical industry.

The new vector system is characterized by a viral and non-viral gene shuttle, into which is cloned a therapeutic gene, which is coupled to the ventricular MLC-2 promoter.

November 17, 1995

## Description

The invention relates to a new vector system for gene therapy of the heart muscle. Fields of application are the medical field and the pharmaceutical industry.

There are various forms of cardiomyopathy. Its clinical picture comprises a group of heart muscle diseases that become manifest as contractile as well as electro-physiologic disorders, and which in the end lead to severe heart insufficiency and/or sudden electro-physiologic heart failure. The search for monogenetic causes in familiar forms of dilative and hypertrophic cardiomyopathies is presently the object of numerous basic scientific and clinical research projects. Thus, genetic causes of heart muscle diseases on a molecular level could be identified only recently. Furthermore, by using molecular-biologic methods, a new understanding of molecular causes of chronic heart insufficiency and cardiomyopathy has been gained. After identifying genetic defects and evidence of a change in gene expression in diseased heart muscle tissue it is possible to correct, or to compensate for, certain molecular changes by transferring genetic material. The transfer of foreign genes to somatic cells of the intact organism as already used in cancer therapy and recently, also in muscular dystrophy, presents a very promising method, which could possibly also be used in interventional cardiology as a gene-therapeutic method. The vehicles most frequently used for somatic gene transfer are non-replicable retroviruses. The prerequisite for a successful retroviral infection is, however, a dividing target cell like, for example, highly proliferating tumor cells. Since a multitude of somatic cells, including cardiomyocytes, can not be

November 17, 1995

divided anymore, retroviral "shuttle-vector" systems can not be used here.

Among the available gene transfer systems, the recombinant adenoviruses have various characteristics, which make them particularly attractive for somatic gene transfer in non-dividing cells.

For this reason, a technique of stable gene transfer in bronchial epithelia for therapy of cystic fibrosis by means of recombinant adenoviruses just recently developed by *Perricaudet* and *Rosenfeld* has attracted much attention. This method could be transferred to non-dividing heart and skeletal muscle cells of a mouse by the *Perricaudet* team. Therapeutically, the adenoviral gene transfer system has already been used for the skeletal muscular system to replace the deficient dystrophin in progressive muscular dystrophy of the Duchenne type. Thus, up to 50% of the skeletal muscle filaments show an expression of the dystrophin protein, provable by means of immune histochemistry, after intra-muscular virus application.

Since some forms of the dilative cardiomyopathy with defective dystrophin protein or dystrophy deficiency have already been described, this previous knowledge could be used as a starting point for specific gene therapy of dystrophinopathy of the heart muscle.

The human adenovirus belongs to the group of double-stranded DNA viruses with a genome of approximately 36 kilobasepairs (Kb). The viral DNA encodes for approximately 2700 different gene products, whereby differentiation is made between early (early genes) and late (late genes) gene products in relation to the adenoviral replication cycle. The early genes are subdivided

November 17, 1995

into four transcriptional units, E1 to E4. The late gene products encode for the capsid proteins. At least 42 different adenoviruses can be differentiated immunologically. The cellular reception of the adenoviruses is done via the mechanism of the receptor-transferred endocytosis into the lysosomal compartment of a multitude of human cell types. Thereafter, the adenoviral genome travels into the cytoplasm and then to the cell nucleus. The transcription of the viral gene requires the expression of the "early region 1", which encodes a transactivator of the adenoviral gene expression. This dependency of the expression of all subsequent viral genes from the E1 transactivator can be used for the construction of the non-replicable adenoviral vectors.

In adenoviral vectors, the E1 gene region is replaced by a foreign gene with its own promoter. As a result of the replacement of the E1 gene region, which is a prerequisite for the expression of the subsequent adenoviral gene, a non-replicable adenovirus is produced. Thereafter, these viruses can only multiply in a cell line, which replaces the deficient E1 gene. Therefore, replication-deficient adenoviruses are formed in the so-called 293 cell line (human embryonal kidney cell line), which has a copy of the E1 region stably integrated in the genome. To accomplish this, foreign genes (galactosidase, for example) are cloned in recombinant adenoviral plasmids under the control of its own promoter (RSV, for example). Subsequently, the homologous recombination between the plasmids pAd.RSV/ $\beta$ -Gal and the E1 deficient adenoviral genome dl327 (adenovirus 5) in the helper cell line 293 takes place. If the recombination is successful, viral plaques are harvested. The replication-deficient viruses thus produced are then used in high titers ( $10^9$  to  $10^{11}$  plaque-forming



November 17, 1995

units) to infect the cell culture or the animals. The size of a recombinant adenoviral genome is limited to approximately 38 to 40 Kb and must, without fail, be taken into consideration when constructing the adenoviral shuttle vectors.

By intravenous (i.v.) application of recombinant adenovirus, the described  $\beta$ -galactosidase reporter gene has already been expressed stably in muscular tissue up to twelve months under the control of the retroviral promoter (RSV). Detailed examinations of the tissue distribution after i.v. application of recombinant adenoviruses with luciferase as reporter gene showed that luciferase activity could be proven in all examined tissues.

Quantitatively, however, a preferential luciferase expression in the livers (99%) of the i.v.-infected animals was evident.

Additional examinations with  $\beta$ -galactosidase-producing adenoviruses showed that approximately 90% of all liver parenchyma cells and liver endothelium cells expressed the foreign gene effectively. In contrast thereto, a fast decrease of the gene expression in the liver occurs when a CMV promoter is used. This shows that with a gene transfer into certain target cells, not only is the method of viral application of great significance, but also the selection of the promoter important for the stable expression. Furthermore, there is the immune response of the receiver organism, which with i.v. application leads to the formation of a high titer of neutralizing antibodies against capsid proteins. These examinations demonstrate the possibility that a repeated gene transfer with recombinant adenoviruses can lead to a substantial decrease of the transfer rate.

November 17, 1995

Only recently, the working group *Leiden* accomplished a stable gene transfer by direct infusion of  $2 \times 10^9$  non-replicable adenoviruses into the coronary arteries of rabbits. With this so-called "Percutaneous Coronary Gene Transfer" (PCGT) method, under the control of the CMV promoter, an expression of the  $\beta$ -galactosidase reporter gene in endothelial as well as in smooth muscle cells could be proven. These examinations demonstrate that basically, different cell types can be obtained through intra-coronary infection. For a targeted expression, a tissue-specific promoter would be very beneficial. For the therapy of heart muscle disorders, the targeted cardiomyocytic expression is of particular interest.

In summary, it is stated that the adenoviral vectors have various advantages for the gene transfer: their independence from the host-cell replication, their foreign DNA packaging capacity of up to 7.5 kb, their highly efficient gene transfer and their great host spectrum. Their ability to infect various cell types, however, can lead to the expression of presumed therapeutic genes in non-target cells and, thus, to undesirable results.

To date, it has not been possible, among other things, to alter adenoviruses in such a way that they can be used for specific expressions in somatic cells (heart muscle cells, for example). Therefore, their application for a gene transfer to heart muscle cells as therapy could not be considered for safety reasons.

Therefore, the object of this invention was to develop an adenoviral shuttle vector system with targeted, if possible exclusive expression activity in heart muscle cells. Based on this system, a therapy concept for monogenetic forms of

November 17, 1995

cardiomyopathies was to be developed, which offers maximum safety from an expression in cells outside the heart muscle.

Secondary objects are the cloning of a heart muscle-specific promoter in the adenoviral system as well as the examination of the specificity, stability and efficiency of the gene expression with the aid of the luciferase and  $\beta$ -galactosidase reporter gene.

It was found that the MLC-2 promoter (myosin light chain-2 promoter) is surprisingly tissue-specific in the adenoviral context. The present invention is based on this finding, which is realized in claims 1, 6, and 7. The dependent claims are preferred variations.

The vector system of this invention is characterized by a viral and a non-viral gene shuttle, into which a therapeutic gene, coupled to the ventricular MLC-2 promoter, is cloned.

Preferred is a vector system, characterized in that an adenovirus is used as basis for the gene shuttle.

Particularly preferred is a vector system, where a recombination-deficient adenovirus is used.

As a therapeutic gene, the cDNA of a gene is used, which is altered, qualitatively and quantitatively, for the disease to be treated.

The invention can also be realized by applying parts or variants of the MLC-2 promoter.

November 17, 1995

The vector system of this invention is produced by replacing the E1 gene region or another region in an adenoviral vector with a therapeutic gene with the MLC-2 promoter.

The preferred application of the new vector system is to apply the recombinant vector system to a patient via the blood stream, preferably via a modified catheter method, into the arterial or venous coronary system.

The invention will be described in more detail with the embodiments below.

1. To establish the somatic gene transfer with adenoviral shuttle vectors, recombinant adenoviruses with luciferase and  $\beta$ -galactosidase reporter genes under control of the MLC-2 promoter are used according to the following diagram:

November 17, 1995

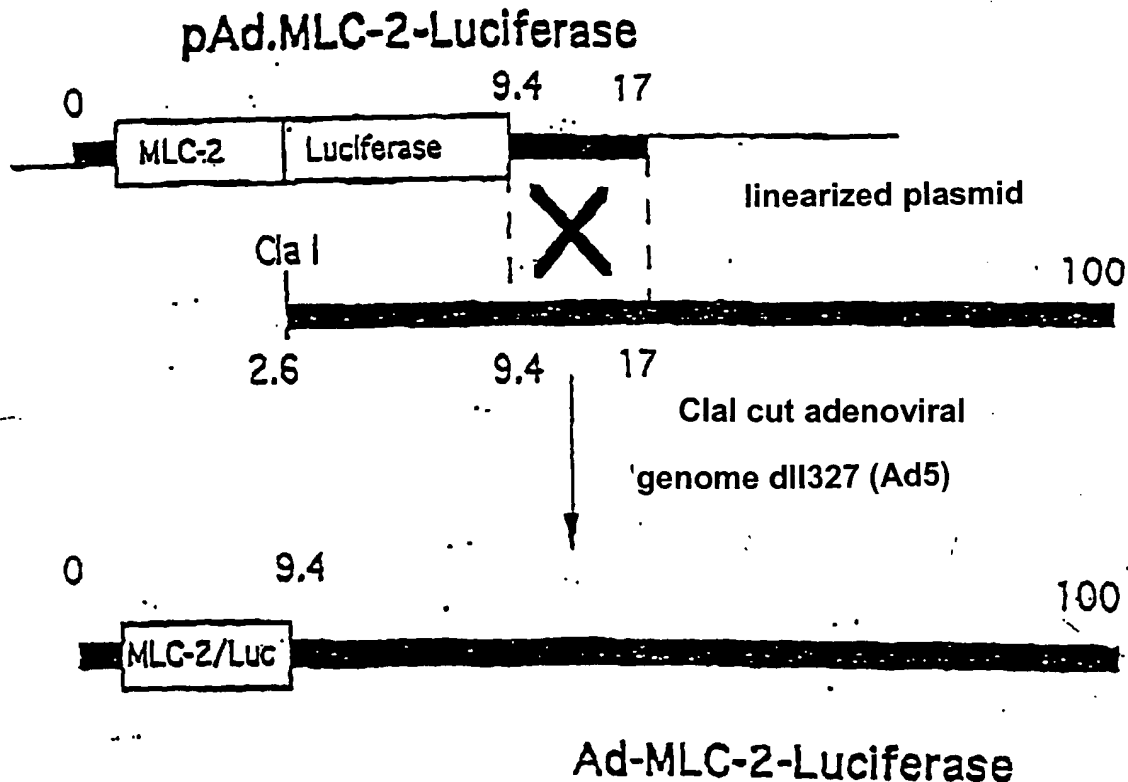


Illustration: Production of the recombinant adenovirus Ad-MLC-2/luciferase by in vivo recombination.

(Legend: top right: linearized plasmid; bottom right: Cla I adenoviral genome dl 1327 (Ad5))

Ad a) Cloning of the the recombinant plasmid pAd.MLC-2/luciferase:

The MLC-2/luciferase fusion construct described in ... is cut from the Bluescript plasmid at the restriction interfaces Kpn I. In a subsequent so-called "Klenow" reaction, the overhanging ends are filled in and, by adding so-called Pvu II Linkers, additional restriction enzyme interfaces are placed on both ends. This 4.0 kB-long MLC-2/luciferase DNA fragment is then coupled, analogous to the recombinant plasmid pAd.RSV $\beta$ gal, to the Pvu II interface at

November 17, 1995

the 3'-end of the 1.3 mu (1 mu - 360 bp) region of the adenovirus type 5 (Ad 5) genome.

The 9.4-17 mu-long DNA fragment of Ad 5, which is necessary for the homologous recombination with the adenoviral genome for the formation of recombinant adenoviruses, attaches itself to the luciferase reporter gene. The correct orientation of the fusion construct is monitored by restriction enzymes and sequencing.

Ad b) Construct of the recombinant adenoviruses Ad-MLC-2-luciferase:

The recombinant adenovirus is created in-vivo by homologous recombination in the 293 cell line between the newly constructed plasmid pAd.MLC-2/luciferase and the adenoviral DNA Ad dl327, whereby the 293 cells are cotransfected with 5 µg of the linearized plasmid pAd.MLC-2/luciferase and 5 µg of the 2.6-100 mu-long (1 mu - 360 bp) Cla I fragment of the adenovirus 5 (Ad 5). After coating the cells with agar and a 10-day incubation at 37°C, the recombinant adenoviral plaques are isolated and tested for their luciferase activity. The recombinant adenoviruses are multiplied in the 293 cell line and centrifuged with cesium chloride gradients. The viral fractions are then titered in the plaque assay using the 293-cell line.

Ad c) In vitro and in vivo infection of cardiomyocytes:

Isolated, neo-natal cardiomyocytes of rats are infected in the cell culture with the recombinant adenoviruses, Ad-MLC-2-luciferase, and tested for the luciferase expression.

November 17, 1995

With successful in-vitro expression of the luciferase, rats are then provided with 20-40  $\mu$ l of purified, recombinant adenoviruses ( $10^{11}$  plaque-forming units/ml) by intravenous injection, later also by "Percutaneous Coronary Gene Transfer"  $2 \times 10^9$  infected particles into the coronary arteries.

Ad d) Proof of the luciferase expression in luciferase assay:

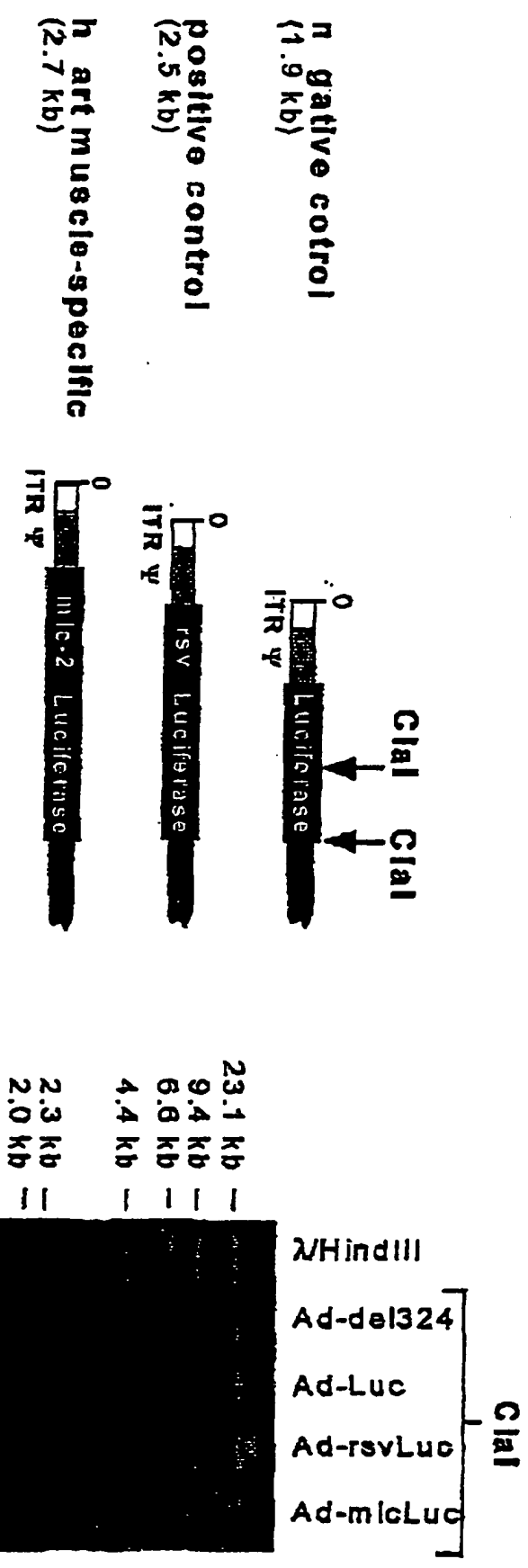
For the luciferase assay, whole-cell protein extracts are made from the infected cardiomyocyte and fibroblast cultures, and later from infected heart muscle tissue. With successful infection and an active MLC-2 promoter, intact luciferase enzyme is found in the cell extract. By adding the substrates Luciferin and ATP and separating the pyrophosphate, a complex of Luciferase-Luciferyl-AMP is formed.

Due to oxidation of Luciferyl, a dissociation of Oxiluciferine, AMP and  $\text{CO}_2$  by emitting a light quantum with the wave length 560 nm occurs. This light emission is registered photometrically in light units (LU) in a transilluminometer and related to the protein quantity.

The results of the examinations are illustrated in the 5 figures below:

## II. Results

### 1. Construction of recombinant virus



**Fig. 1:** The replication defective recombinant adenoviruses were constructed as described previously. The viruses are derivatives of adenovirus del324 (Ad5) with a deletion in E1 and the transgene replacing E1. The figure shows the left terminal region of the constructed viruses (ITR = Inverted Terminal Repeat,  $\psi$  = packaging sequence, rsv = rous sarcoma virus-promoter, myc-2 = myosin light chain 2-promoter) with different promoters driving the reporter gene luciferase. The negative control has no promoter (Ad-Luc), the positive control has the rsv promoter (Ad-rsvLuc) and the heart muscle specific construct has the myc-2 promoter in front of the luciferase gene (Ad-micLuc). Clal restriction sites of the viral constructs are indicated in the drawing, the corresponding fragment length is given in brackets (left) and are visual on the agarose gel. The recombinant viruses were plaque purified two times before the viral clone was prepared large scale by two times CsCl Centrifugation. Viral DNA of the large scale virus production was isolated and restriction analysis confirmed the the recombinant phenotype. Additionally 50ng of viral DNA was tested by PCR for wild type adenovirus by 5 contamination (BioTechniques...). No wildtype contamination was found (data not shown). The viral stocks were titrated two times on cells before infection experiments were done. The three constructs ranged from  $7 \times 10^6$  -  $1.8 \times 10^8$  p.f.u./ml.



18-11-95 01:22

17.11.95

## 2. Infection of tissue culture cell lines

adenovirus Ad-mLuc is „transcriptionally silent“ in all investigated cell lines in terms of luciferase expression

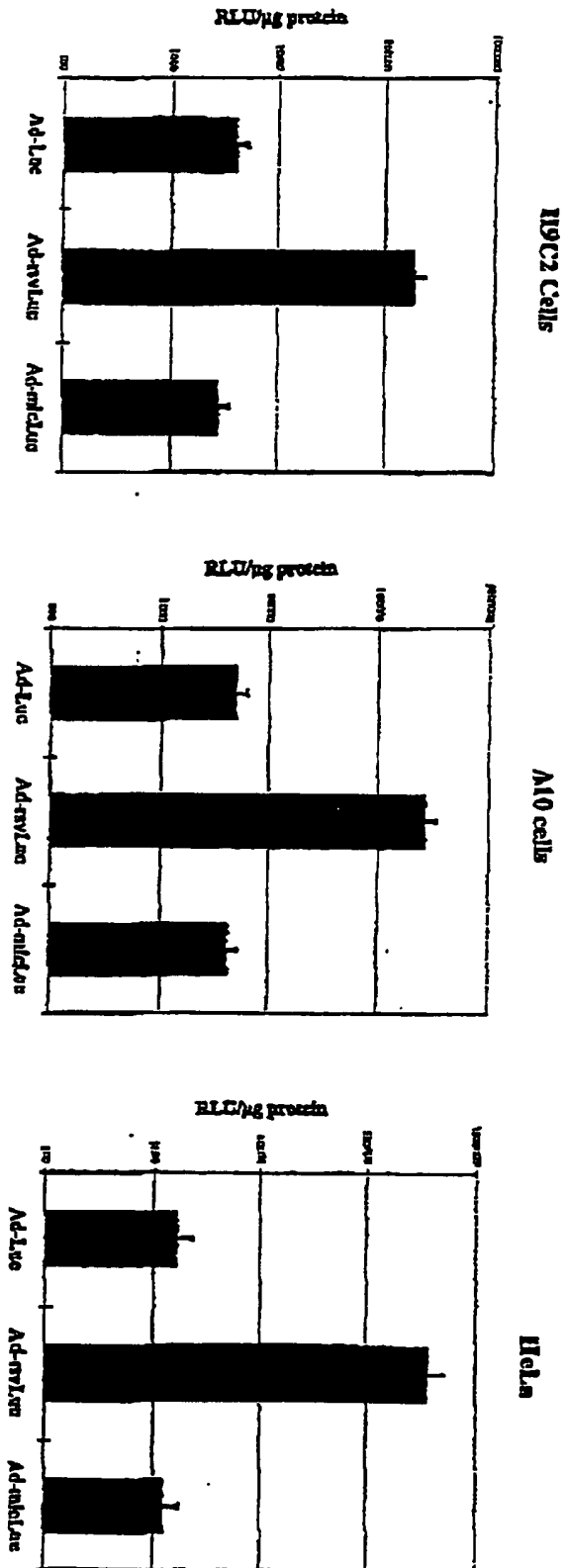


Fig.2.: Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/μg protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-mLuc and Ad-mLuc in H9C2 cells (heart myoblast, rat), A10 cells (smooth muscle cells, rat) and HeLa cells (cervical carcinoma, human). Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay were done according to standard procedures. Luciferase expression of Ad-mLuc infected cell lines were lower as the negative control Ad-Luc. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean..

17.11.95

### 3. Infection of primary cells in tissue culture

#### • adenovirus Ad-mLac specifically expresses luciferase in neonatal cardiomyocytes in vitro

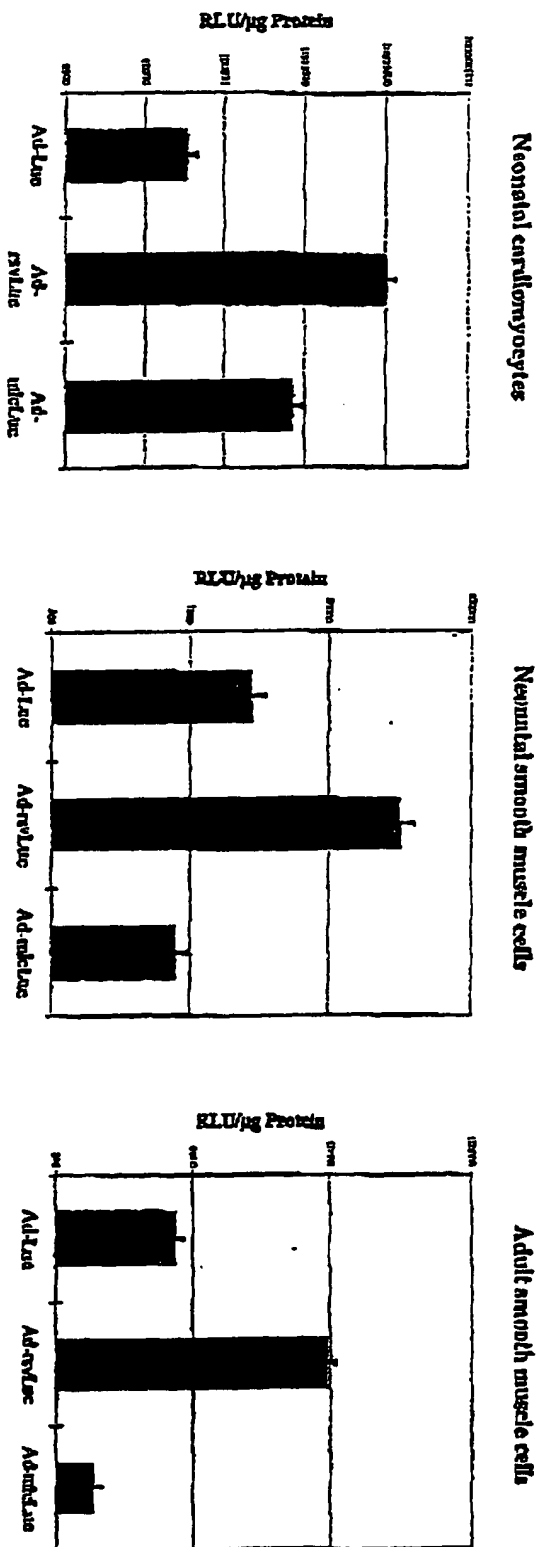


Fig.2.: Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/µg protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Lac, Ad-rsLac and Ad-mLac in primary neonatal cardiomyocytes (rat), primary neonatal and adult smooth muscle cells (rat). Cardiomyocytes were infected two days after preparation from two-three days old animal, smooth muscle cells were infected at passage numbers 1-3. Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay were done according to standard procedures. Luciferase expression of Ad-mLac infected in cardiomyocytes was 8% of Ad-rsLac and about 10-fold compared to Ad-Lac. In smooth muscle cells Ad-mLac was about 0.25 of Ad-Lac. Each bar represents an arithmetic mean of four to five experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

17.11.95

#### 4. Intracardial infection of neonatal rats

adenovirus Ad-m1Luc specifically expresses luciferase in the myocardium in vivo

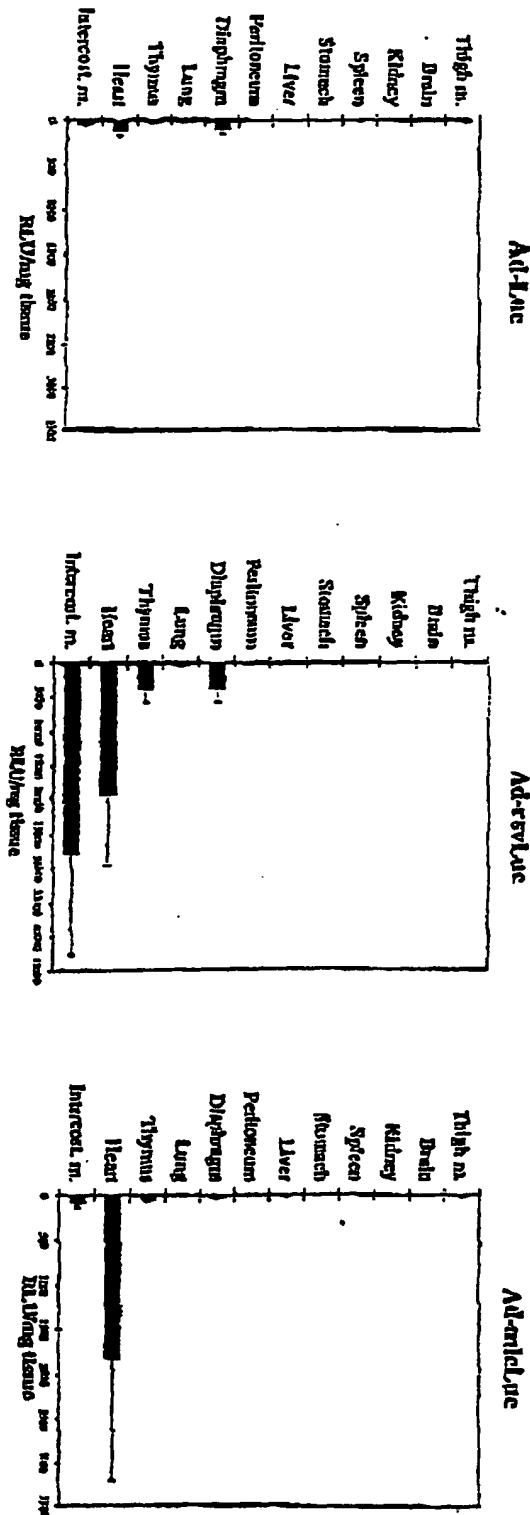
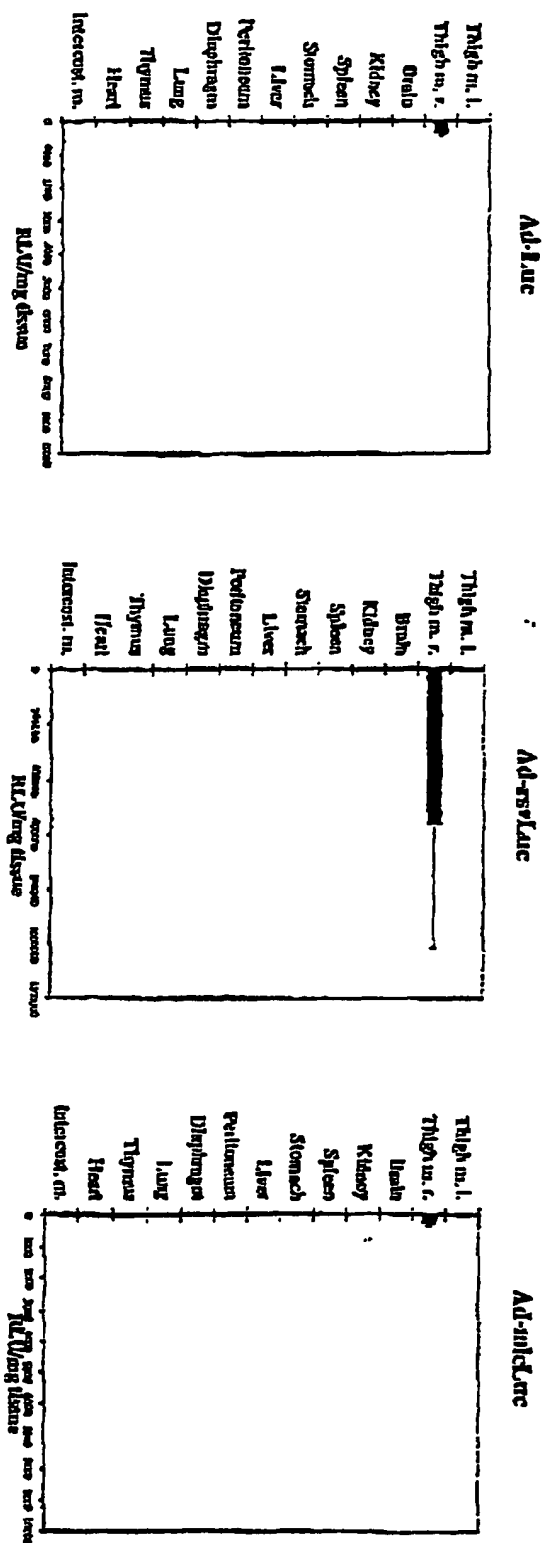


Fig.4.: Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rvLuc and Ad-m1Luc. Five days after administration of  $1.5 \times 10^9$  plaque forming adenoviral particles in a 20  $\mu$ l volume into the left ventricle of the heart, luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU) per mg tissue in each of 12 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

17.11.95

## 5. Intramuscular injection of recombinant adenoviruses into thigh muscle of neonatal rats

- adenovirus Ad-rsvLuc strongly expresses luciferase in the thigh muscle in vivo
- adenovirus Ad-m1Luc is "transcriptionally silent" in thigh muscle



**Fig.5:** Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-m1Luc. Five days after administration of  $1.5-1.8 \times 10^9$  plaque forming adenoviral particles in a 20µl volume into the thigh muscle of the left hind leg luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU)/mg tissue in each of 13 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

November 17, 1995

Patent Claims

1. Vector system for gene therapy of the heart muscle, characterized by a viral and a non-viral gene shuttle, into which a therapeutic gene, coupled to the ventricular MLC-2 promoter, is cloned.
2. Vector system according to claim 1, characterized in that an adenovirus is used as basis for the gene shuttle.
3. Vector system according to claims 1 and 2, characterized in that a recombination-deficient adenovirus is used.
4. Vector system according to claims 1 to 3, characterized in that the therapeutic gene is the cDNA of a gene, which is altered, qualitatively or quantitatively, for the disease to be treated.
5. Vector system according to claims 1 to 3, characterized in that parts or variants of the MLC-2 promoter are used.
6. Method for production of the vector system according to claims 1 to 4, characterized in that in an adenoviral vector, the E1 gene region or another region is replaced by a therapeutic gene with the MLC-2 promoter.
7. Method for application of the vector system according to claims 1 to 4, characterized in that the recombinant vector system is applied to the patient via the blood stream, preferably via a modified catheter method, into the arterial or venous coronary system.